

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-184552
(43)Date of publication of application : 16.07.1996

(51)Int.Cl.

G01N 21/27
G01N 21/21
G01N 21/64
G02B 21/00

(21)Application number : 06-329165

(71)Applicant : RES DEV CORP OF JAPAN
IKETAKI YOSHINORI

(22)Date of filing : 28.12.1994

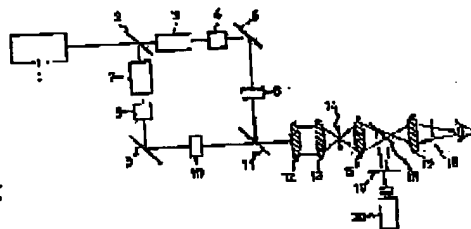
(72)Inventor : IKETAKI YOSHINORI
FUJII MASAOKI

(54) MULTI-WAVELENGTH OPTICAL MICROSCOPE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain much information accurately with high contrast by exciting a sample molecule with lights having different wavelength and obtaining an absorption image accompanying transition from the ground state to a high order exciting state or a luminous image produced upon de-excitation.

CONSTITUTION: Laser light from a pump light source 1 is passed through a spectroscope 2 and dye lasers 3, 7 and conditioned to have a resonance wavelength λ_1 for making transition from the ground state to a first exciting state and a resonance wavelength λ_2 for making transition from to a second higher order exciting state. The optical paths of the lights having the wavelength λ_1 and λ_2 are then aligned by means of a half mirror 11 in order to irradiate a sample 14 and an absorption image is obtained from the compositional molecules of the excited sample 14 in the electron absorption process and a luminous image is obtained from the fluorescence at the time of returning from the excited state to the ground state. Contrast of the transmission image of light having wavelength λ_2 is conditioned by controlling the intensity of light having wavelength λ_1 with the output from the laser 3. Orientation of molecule can also be observed and identified by turning 6, 10 the plane of polarization of lights having wavelength λ_1 , λ_2 at the time of exciting the valence electron.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 01.08.1997
[Date of sending the examiner's decision of rejection] 08.02.2000
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of final disposal for application] 3164989
[Patent number] 02.03.2001
[Date of registration] 2000-05037
[Number of appeal against examiner's decision of rejection] 03.03.2000
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

Copyright (C): 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-184552

(43) 公開日 平成8年(1996)7月16日

技術表示協所

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F 1
G 0 1 N 21/27	E		
21/21	Z		
21/64	E		
G 0 2 B 21/00			

審査請求 未請求 請求項の数 2 OL (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平6-329165
(22) 出願日 平成6年(1994)12月28日

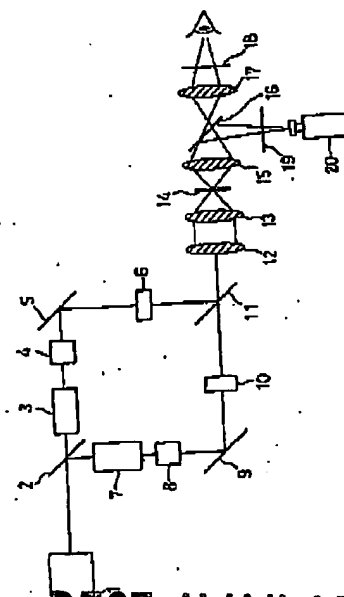
(71) 出願人 390014535
新技術事業団
埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(71) 出願人 595001804
池滝 慶記
東京都青梅市河辺町4丁目-21-5-206
(72) 発明者 池滝 慶記
東京都青梅市河辺町4丁目-21-5-206
(72) 発明者 藤井 正明
神奈川県横浜市中区桜台44-97 パスト
ラール桜台106
(74) 代理人 弁理士 西澤 利夫

(54) 【発明の名称】 多波長光光学顕微鏡

(57) 【要約】

【目的】 像のコントラストが良く、試料に関する情報量を多く得ることができる高精度の多波長光光学顕微鏡を提供する。

【構成】 複数の光源 (3) (7) を設置し、各光源の波長を別々にそれぞれ可変する機能を有する波長可変手段 (4) (8) を具備し、必要に応じて各光源の光路に偏光面回転子 (6) (10) を具備する。



BEST AVAILABLE COPY

特開平8-184552

(2)

2

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 複数の光源を設置し、各光源の波長を別々にそれぞれ可変する機能を有する波長可変手段を備え、各光源からの照射光の波長を異ったものとして試料分子の基底状態から励起状態への遷移にともなう吸収像、もしくは励起状態から基底状態へ戻る際の発光像を得ることを特徴とする多波長光光学顕微鏡。

【請求項2】 各光源の光路に偏光面回転子を具備してなることを特徴とする請求項1記載の多波長光光学顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、像のコントラストが良く、試料に関する情報量を多く得ることができる高精度の多波長光光学顕微鏡に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、試料の拡大像だけではなく、同時にその化学組成などの情報量を得る際に好適に用いることのできる多波長光光学顕微鏡に関するものである。

【0002】

【従来の技術とその課題】 従来より、光学顕微鏡は、様々な構造のものが開発され、利用されている。また、近年、レーザー技術、電子画像技術などの周辺技術の進歩により、さらに高精度の光学顕微鏡システムが開発されている。たとえば、明視野顕微鏡（透過型顕微鏡）、暗視野顕微鏡、走査型レーザー顕微鏡などがある。

【0003】 このうちの透過型顕微鏡は、光源の白色光を試料に照射しその透過像を観察するもので、透過型の生物顕微鏡として利用されている。そして、この透過型顕微鏡を観察試料の形態特徴にあわせて応用した、位相差顕微鏡、偏光顕微鏡、微分干渉顕微鏡（ノマルスキー型顕微鏡）が知られている。

【0004】 位相差顕微鏡は、透明で厚さや屈折率が周囲（媒質）と異なった物体、つまり位相差情報のみを有する物体の観察に用いられ、位相差情報を光の干渉を利用することにより振幅強度に変換することにより観察を可能としたものである。偏光顕微鏡は、鉱物、繊維、結晶などの観察に利用され、物質の持つ異方性を観察するものである。

【0005】 微分干渉顕微鏡は、位相差顕微鏡と同様に無線色試料の観察に利用され、光波が試料で受ける位相変化を干渉像に変換することにより観察するものである。偏光干渉を利用したノマルスキー型顕微鏡が有名である。次に、前記の暗視野顕微鏡は、試料からの散乱光または回折光により像を得て観察するものである。照明光の開口数が対物レンズの開口数より大きい構造となっていて、直接光は入射せず、真暗なバックグラウンドの中に、散乱、蛍光または回折を引き起こす部分が輝いて像となって見える。近年では、この暗視野顕微鏡の応用として光源にパルスレーザーを用いたパルスレーザー顕微鏡が開発されている。

【0006】 また、走査型レーザー顕微鏡はレーザービームにより試料表面を走査し、透過像や蛍光像を観察するものである。このように、従来より様々な方式と構造の光学顕微鏡が利用されてきた。しかしながら、これらの従来の光学顕微鏡は、試料への照明構造に問題があるために、像のコントラスト等の画質が不十分であり満足に行く像を得ることができなかった。また従来の単一波長による照明では、ある程度特定の分子の吸収像あるいは蛍光像を観察することが可能ではあったが、一般にいくつかの分子の吸収帯の波長領域は重複するために試料の化学組成の正確な同定までは不可能であった。よって、試料に関する得られる情報量が少なく不十分であるといった問題があった。

【0007】 画像のコントラストは試料の厚みのみに依存するため、透過型顕微鏡においては画試料が厚ければコントラストも一義的に決まってしまう。従って、コントラストを調整することができない。特に白色光を光源として用い、さらに試料が生物試料のような無色透明である場合には、光の吸収が少ないためにコントラストの良い像を得ることができなかった。このため、従来は薬品により試料を染色することで像のコントラストの調整を行っていた。しかし、この薬品による染色は試料の組成変化を引き起こすことがあるため、本来の試料の様子を観察できていないという可能性があった。特に生体試料の場合には薬品のためにその生命活動を停止させてしまうという危険性もあった。この薬品による染色は明視野顕微鏡においてもしばしば利用されているが、光源を分光し試料の吸収帯の波長で照明する場合でも、吸収が強すぎてしまうと全体が暗い画像になってしまうため、やはり、コントラストの悪い像になってしまうこともあった。このように、従来ではコントラストなどの画質や情報量が不十分なことと、観察の不安定性といった問題があった。

【0008】 この発明は、上記のような従来技術の欠点を解決するために創案されたものであって、従来の光学顕微鏡の欠点を解消し、像のコントラストが良く、試料に関する情報量を多く得ることができる、高精度な多波長光光学顕微鏡を提供することを目的としている。

【0009】

【課題を解決するための手段】 上記課題を解決するものとして、この発明は、複数の光源を設置し、各光源の波長を別々にそれぞれ可変する機能を有する波長可変手段を備え、各光源からの照射光の波長を異ったものとして試料分子の基底状態から第1励起状態および第1励起状態を含む高次の励起状態よりさらに高次の励起状態への遷移にともなう吸収像、もしくはこれらの励起状態から脱励起する際の発光像を得ることを特徴とする多波長光光学顕微鏡を提供する。

【0010】 そして、この発明は、各光源の光路に偏光面回転子を具備することをその一つの態様として提供する

特開平8-184552

(3)

4

3

る。

【0011】

【作用】上記の通りのこの発明の多波長光光学顕微鏡では、各照射光の波長を異なったものとすることができるので、試料を構成する分子を基底状態から第1励起状態および第1励起状態を含む高次の励起状態よりさらに高次の励起状態へ遷移させ、その吸収過程により吸収像を得ることができ、また、これらの励起状態から脱励起する際に発光される蛍光または燐光により発光像を得ることができる。また、各照射光の波長を別々に調整することができるので、得られる像のコントラストを容易に調整することができる。また、各波長は試料の分子に固有のものとなるので、試料の化学組成の同定もすることができる。

【0012】原理的に説明するために、試料を構成する分子の価電子軌道の電子を飽和軌道から空軌道へ励起させることにより基底状態から第1励起状態へ遷移させる光の共鳴波長を λ_1 とし、この共鳴波長 λ_1 により生成された空孔に近接する飽和軌道の電子を励起させることにより第1励起状態から第2励起状態へ遷移させる光の共鳴波長を λ_2 とすると、この共鳴波長 λ_1 、光と共鳴波長 λ_2 、光との関係は、以下の通りとなる。

【0013】図2は、試料としてのベンゼン分子の価電子軌道の電子構造である。この図2に示されるように、一般に、生体試料などの個体試料は最外殻の価電子軌道が飽和している高分子である。図3は、図2の分子の第1励起状態である。共鳴波長 λ_1 ：光により飽和価電子軌道2から空軌道の価電子軌道3へ励起することにより基底状態から第1励起状態へ遷移する。図4は、第2励起状態である。共鳴波長 λ_2 ：光により共鳴波長 λ_1 により生成された価電子軌道2の空孔に飽和価電子軌道1の電子を励起することにより第1励起状態から第2励起状態へ遷移する。図5は、図4の第2励起状態から基底状態に戻る状態である。分子は励起状態から基底状態に戻る際に蛍光または燐光を発光する。ここで、図6に励起過程（吸収過程）を示す。図6に示される過程において、*

*基底状態から第1励起状態へ励起する時の吸収断面積を σ_1 、その時の第1励起状態の寿命を τ 、第1励起状態から第2励起状態へ励起するときの吸収断面積を σ_2 とする。また共鳴波長 λ_1 の光子フラックスを I_0 、照射時間を T 、共鳴吸収により観察しようとする分子の密度を N とすると、時間 t における基底状態にある分子の密度 N は以下の平衡方程式で表わされる。

【0014】

【数1】

$$\frac{dN}{dt} = -I_0\sigma_1N + \frac{N_0 - N}{\tau}$$

【0015】また、初期条件 $t=0$ ： $N=N_0$ で、時間 T 後における第1励起状態にある分子の密度 n は次式で表わされる。

【0016】

【数2】

$$n = \left[1 - \exp \left\{ - \left(I_0\sigma_1 + \frac{1}{\tau} \right) T \right\} \right] \frac{N_0 I_0 \sigma_1 \tau}{1 + I_0 \sigma_1 \tau}$$

【0017】ところで、試料に十分な厚みがある場合、共鳴波長 λ_1 の光は試料内を進行する際にその侵入深さに応じてその光子フラックス I_0 が減衰するので、 n は光の侵入距離 x の関数 $n(x)$ ということになる。よって、 $n(x)$ は【数2】 I_0 を $I_0 \exp(-\mu x)$ で置き換えたものになる。ここで、 μ は線吸収係数であり、以下の式で表わされる。

【0018】

【数3】

$$\mu = \sigma_1 N_0$$

【0019】従って、これらより【数2】は以下の式に書きなおされる。

【0020】

【数4】

$$T(L) = \exp \left[- \sigma_2 \int_0^L n(x) dx \right]$$

【0021】ここで、波長 λ_1 ：光と波長 λ_2 ：光を同じ光路で試料を照明した場合、波長 λ_1 ：光を照射しないときの波長 λ_2 ：光の吸収はないとすると、波長 λ_1 ：光を照射終了直後の厚み L の試料に対する波長 λ_2 ：光の透過率 $T(L)$ は以下の式で表わされる。

【0022】

【数5】

【0023】一般に、 τ は、1nsec程度であり、また波長 λ_1 ：光の照射時間はパルスレーザーを用いる場合10nsec程度もあり $T \gg \tau$ と近似できる。しかも、 L が十分大きいと仮定すると、数5は以下の式で表わせられる。

50 【0024】

BEST AVAILABLE COPY

特開平8-184552

(4)

6

5

【数6】

$$T(L) = (1 + I_0 \sigma_1 \tau)^{-\frac{\sigma_2}{\sigma_1}}$$

【0025】この式より、 $T(L)$ は I_0 の関数であり、 I_0 が増大すると $T(L)$ は単調に減少するのがわかる。従って、共鳴波長 λ_1 、光のフォトンフラックス I_0 の制御により共鳴波長 λ_1 、光による透過像を完全に制御することができる。また、フォトンフラックス I_0 の制御により $n(x)$ も制御できるので、励起状態より基

底状態に戻る際に発光される蛍光または燐光の発光強度も制御できる。従って、共鳴波長 λ_1 、光により共鳴波長 λ_2 、光の像を調整することができるのである。

【0026】このように分光されたレーザー光を別々にそれぞれ調整することができる波長可変機能が付与された構造となっているので、容易に像のコントラストを調整でき、良いコントラストを得られる。また、さらに波長 λ_1 と波長 λ_2 の2波長の照明により試料の化学分析も可能である。最外殻価電子軌道は分子に固有なエネルギー単位を持っているので、波長 λ_1 も波長 λ_2 も分子に固有なものとなる。従って、2波長により吸収あるいは発光する分子を限定するので従来よりも正確な試料の化学組成の同定ができる。これにより透過像情報以外の試料に関する情報量を得ることができる。

【0027】また、この発明では光路に偏光面回転子を設けることにより、各波長の光の偏光面を制御することができるので、分子の配向方向を同定することが可能ともなる。

【0028】

【実施例】以下、実施例を示し、さらに詳しくこの発明について説明する。もちろんこの発明は以下の例によって限定されるものではない。図1は、この発明の一実施例としての多波長光学顕微鏡であり、光源として2台の色素レーザー(3)、(7)を用いた2波長光学顕微鏡である。

【0029】ポンプ光源(1)にはNd:YAGレーザーを用いている。ポンプ光源(1)に隣接して設置されたハーフミラー(2)によりレーザー光が分光され、分光された2つのレーザー光はそれぞれ色素レーザー(3)と色素レーザー(7)をポンプする。これにより2つの光源となる。色素レーザー(3)の波長の調整は、試料を構成する分子の価電子軌道の電子を飽和軌道から空軌道へ励起させることにより基底状態から第1励起状態へ遷移させることのできる共鳴波長 λ_1 に調整する。ここで、短波長の光を必要とする場合には、その必要に応じて、SHG、セカンドハーモニクスオシレータ(4)を色素レーザー(3)後側に設置し短波長化する。一方、色素レーザー(7)の波長は、共鳴波長 λ_1 により生成された空孔にその空孔の軌道に近接する飽和軌道の電子を励起させることにより第1励起状態から第

2励起状態へ遷移させることのできる共鳴波長 λ_2 に調整する。ここで、レーザー光を短波長化する場合には、同様にSHG(8)を色素レーザー(7)の後側に設置し短波長化する。これらにより、光源を共鳴波長 λ_1 と共鳴波長 λ_2 の2波長光とすることができる。次に、波長 λ_1 、光と波長 λ_2 、光はそれぞれミラー(5)とミラー(9)により方向を変えられ、ハーフミラー(11)でそれぞれの光路が一致され、同じ光路で進む。各波長光はテレスコープ(12)により拡大され、コンデンサーレンズ(13)で試料(14)に照射される。試料を構成する分子はこの照射されたレーザー光により励起され、そのときの電子の吸収過程により吸収像が得られる。また、励起状態から基底状態へ戻る際に発光される蛍光または燐光により発光像が得られる。これらの像は対物レンズ(15)により拡大されハーフミラー(16)を介して接眼レンズ(17)により観察者の網膜上に結像される。ここで、波長 λ_1 の光をカットし、波長 λ_2 の光による像のみを観察できるようにするために接眼レンズ(17)の後側にその必要に応じて随時フィルター(18)が挿入できるようになっている。また、対物レンズ(15)と接眼レンズ(17)の間に設置されたハーフミラー(16)で反射された光はその光路が変更され、その変更された光路上に接眼レンズとは別に設置されたテレビカメラ(20)により透過像を同時に観察することができる。この時、同様に波長 λ_1 の光をカットし、波長 λ_2 の光による像のみを観察できるようにするためにハーフミラー(16)とテレビカメラ(20)の間にフィルター(19)が随時挿入可能となっている。

【0030】この2波長光学顕微鏡において、共鳴波長 λ_1 、光による透過像のコントラストの調整は、色素レーザー(3)の出力を調整することにより共鳴波長 λ_1 、光の強度を制御することで行うことができる。また、さらにこの2波長光学顕微鏡には、波長 λ_1 、光の光路に偏光面回転子(6)がミラー(5)とハーフミラー(11)の間に設置され、波長 λ_2 、光の光路に偏光面回転子(10)がミラー(9)とハーフミラー(11)の間に設置されている。これは、価電子が励起されるときは分子軸に対して特定の電場ベクトルを持つ光が吸収されるので、波長 λ_1 、光の偏光面(方向)を偏光面回転子(6)により制御し、また波長 λ_2 、光の偏光面(方向)を偏光面回転子(10)により制御することで、分子の配向方向をも同時に観察し同定することができるものである。これにより透過像情報以外の試料に関する情報量をさらに得ることができる。この偏光面回転子としては、波長板またはプリズムを用いることができる。

【0031】もちろん、この発明の多波長光学顕微鏡は、前記のような2波長光を利用したものに限られず、色素レーザーなどの波長可変レーザーを増設してもよいことはもちろんである。3波長以上の光源の光学顕微鏡

特開平8-184552

(5)

8

とすることができる。また、光源としては水銀ランプなどの白色光源を用いてもよく、この場合は、回折格子などを設置して多波長に分光した後、それぞれの光の光路を描いて試料を照明することにより像を得ることができる。

【0032】なお、この発明の多波長光光学顕微鏡は、各種の明視野顕微鏡に適用するだけでなく、蛍光顕微鏡などの暗視野顕微鏡や走査型レーザー顕微鏡にも適用することができることはいうまでもない。

【0033】

【発明の効果】この発明は、以上詳しく説明したように構成されているので、いかに記載されるような効果を奏する。

(イ) 各照射光の波長を異なったものとするので、試料を構成する分子を基底状態から第1励起状態および第1励起状態を含む高次の励起状態よりさらに高次の励起状態へ遷移させ、その吸収過程により吸収像を得ることができ、また、励起状態から脱励起する際に発光される蛍光または燐光により発光像を得ることができる。

【0034】(ロ) また、各照射光の波長を別々に調整することができるので、得られる像のコントラストを容易に調整することができる。

(ハ) また、各波長は試料の分子に固有のものとなるので、試料の化学組成の同定もすることができる。従って、試料の拡大像だけでなく、同時にその化学組成などの情報量を得ることができる。

【0035】(ニ) 各波長の光の偏光面を制御することができるので、分子の配向方向を同定することができる。従って、試料に関する情報量を多く得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明の一実施例としての多波長光光学顕微鏡の構成図である。

【図2】試料（ベンゼン）を構成する分子の価電子軌道の電子構造の模式図である。

【図3】図2の分子の第1励起状態の模式図である。

【図4】図2の分子の第2励起状態の模式図である。

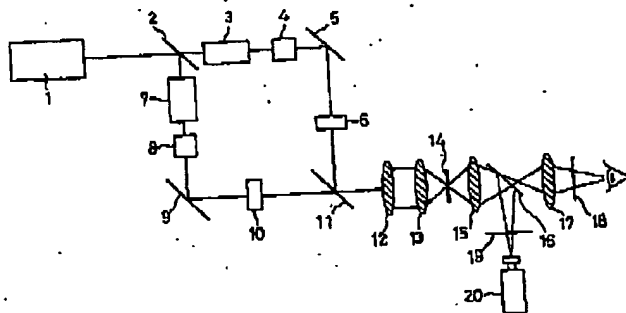
【図5】図4の第2励起状態から基底状態に戻る状態の模式図である。

【図6】分子の励起過程（吸収過程）を例示した図である。

【符号の説明】

- 1 ポンプ光源
- 2 ハーフミラー
- 3 色素レーザー
- 4 SHG、セカンドハーモニクスオシレータ
- 5 ミラー
- 6 偏光面回転子
- 7 色素レーザー
- 8 SHG
- 9 ミラー
- 10 偏光面回転子
- 11 ハーフミラー
- 12 テレスコープ
- 13 コンデンサーレンズ
- 14 試料
- 15 対物レンズ
- 16 ハーフミラー
- 17 接眼レンズ
- 18 フィルター
- 19 フィルター
- 20 ビデオカメラ

【図1】

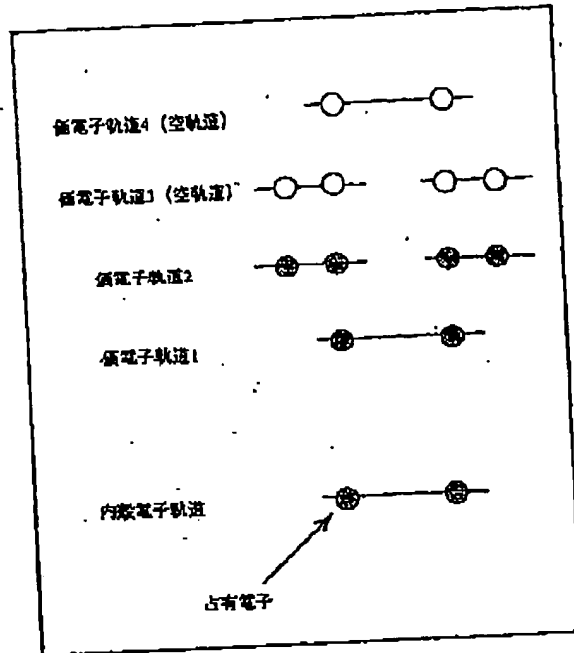


BEST AVAILABLE COPY

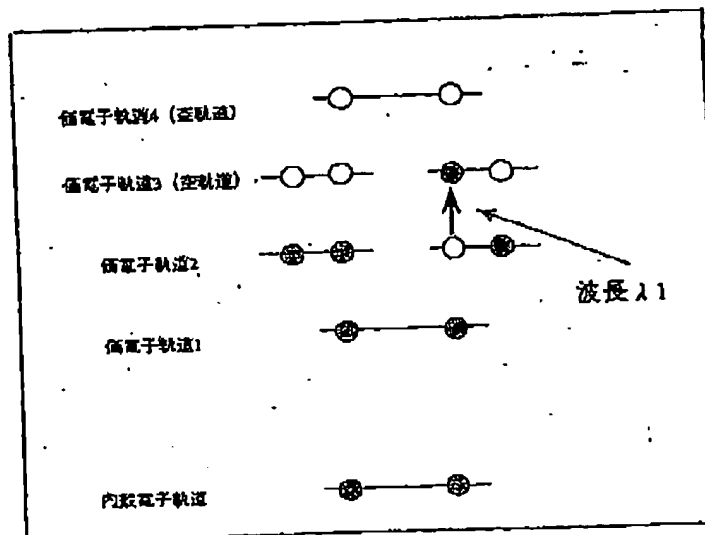
特開平8-184552

(6)

【図2】



【図3】

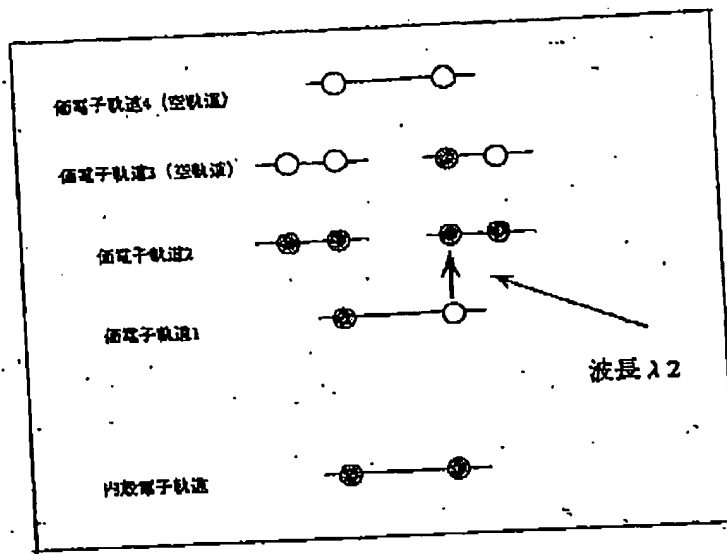


BEST AVAILABLE COPY

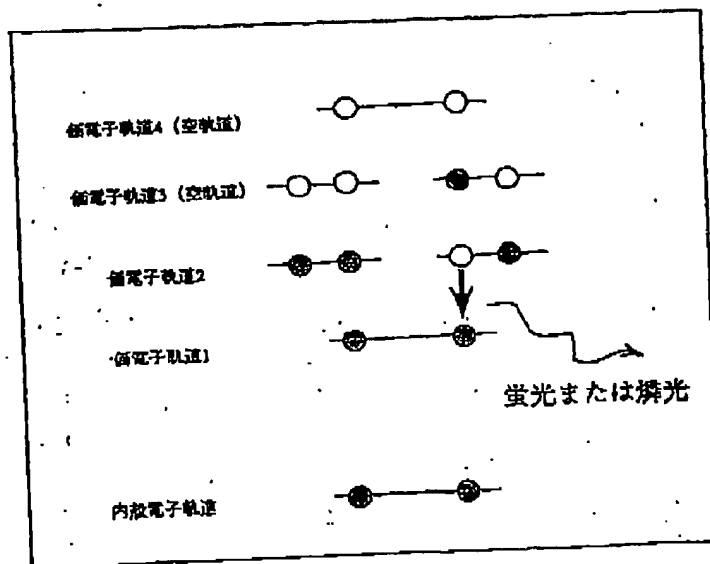
特開平8-184552

(7)

【図4】



【図5】

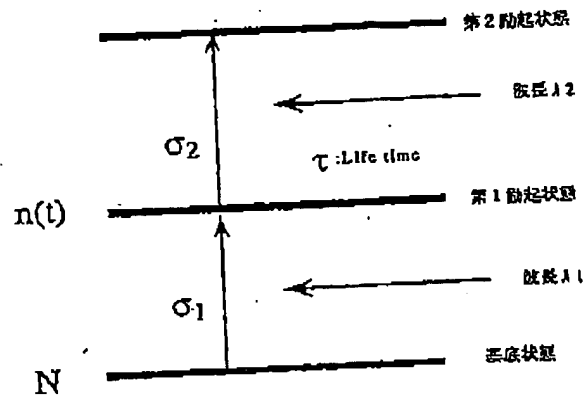


BEST AVAILABLE COPY

特開平8-184552

(8)

【図6】



BEST AVAILABLE COPY